

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特願平10-17488

(43)公開日 平成10年(1998)1月20日

(51)Int.Cl. <sup>*</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 38/00	ABL		A 61 K 37/02	ABL
	AED		C 07 K 5/08	Z NA
// C 07 K 5/08	Z NA		7/64	
7/64			14/78	
14/78			A 61 K 37/02	AED

審査請求 未請求 請求項の数5 OL (全6頁)

(21)出願番号 特願平8-164849

(71)出願人 000000044

旭硝子株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目1番2号

(22)出願日 平成8年(1996)6月25日

(72)発明者 塚本 洋子

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地

旭硝子株式会社中央研究所内

(72)発明者 笹部 哲生

大阪府羽曳野市はびきの3-7-1 大阪  
府立羽曳野病院内

(72)発明者 岸田 健一

大阪府羽曳野市はびきの3-7-30 大阪  
府立看護大学内

(74)代理人 弁理士 泉名 謙治

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 緑内障治療薬

(57)【要約】

【課題】緑内障の治療に有用な薬剤を提供する。

【解決手段】アルギニンーグリシンーアスパラギン酸またはアルギニンーサルコシンーアスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むペプチドを有効成分とする緑内障治療薬。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】アルギニン-グリシン-アスパラギン酸またはアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むペプチド、またはそのペプチドの薬学的に許容できる塩、を有効成分とする緑内障治療薬。

【請求項2】ペプチドが、アミノ酸残基数20以下のペプチドである、請求項1の緑内障治療薬。

【請求項3】ペプチドが、N末端とC末端とがペプチド結合により環状化されている環状ペプチドである、請求項1または2の緑内障治療薬。

【請求項4】環状[-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]からなるアミノ酸配列を有する環状ペプチドを有効成分とする緑内障治療薬。

【請求項5】徐放性担持体に担持された請求項1、2、3または4のペプチドまたはその塩からなる緑内障治療薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、特定のペプチドまたはその薬学的に許容できる塩を有効成分とする緑内障治療薬に関する。20

## 【0002】

【従来の技術】アルギニン-グリシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列（以下RGD配列という）を含むペプチド（以下RGDペプチドという）は、細胞の細胞外基質への接着に関与するペプチドとして見いだされ、試験管内評価において種々の生理活性が見いだされてきた。RGDペプチドの癌転移阻害効果や血小板凝集阻害効果などについては、すでに報告され、癌転移阻害剤または抗血栓剤としての有効性が認められている。また、骨粗鬆症の治療薬の可能性についても報告されている。しかし、RGD配列を含む蛋白質の存在は広く生体内で知られており、さらに多くの薬効が想定される。

【0003】一方、RGDペプチドの生理活性は比較的低分子量のペプチドであるが故に体内での不安定性、早い体内クリアランスなどから問題点が多数あった。これらの問題を解決するために、環状ペプチドの両末端をペプチド結合によって環状化することによって活性の向上、体内での安定性を高まることが証明されている（特開平2-174797号公報参照）。また、このRGD配列におけるグリシン残基の代わりにサルコシン（すなわち、N-メチルグリシン）残基が存在するアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むRGDペプチド類縁体は、RGDペプチドと同様の生理活性を有することが知られている。さらに本発明者らによってこのRGDペプチド類縁体を上記のように環状化することによってRGDペプチドと同様に活性の向上、体内での安定性を高まることが証明されている（特開平4-264097号公報参照）。さらには、このような環状ペプチドや他の手段で（たとえばジスルフィド結合

2

で）環状化した環状ペプチドも知られている（特表平3-501610号公報や特表平5-508860号公報参照）。以下、このRGDペプチド類縁体もRGDペプチドという。

【0004】ペプチド結合により環状化された環状ペプチドの合成には液相合成法の他、オキシム樹脂法(W.F.D eGrado, E.T.Kaiser; J.Org.Chem., 45, 1295-1300, 1980)を用いた固相合成法による環状ペプチドの合成が知られている。また、本発明者らによても固相合成法の改良法が提案されている（本出願人の出願にかかる特開平5-25196号公報参照）。

【0005】このような環状ペプチド合成方法が開発されたことにより、多数の環状ペプチドが短期間に合成されるようになり、高活性あるいは高い特異性を持つ新たなRGDペプチドの発見が導かれるとともに、新しい生理活性についての評価が可能となった。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、RGDペプチドを眼科疾患の処置剤としての有効性について検討した。上記特表平5-508860号公報には、眼球炎症疾患の治療剤としての環状RGDペプチドの用途が示唆されている。しかしながら、どのような眼球炎症疾患にどのように有効であるかは記載されていない。本発明者はRGDペプチドについて緑内障治療薬としての有効性について検討した。

【0007】緑内障に関しては、緑内障手術である線維柱体切除術は、切除した線維柱体部を通して眼内の房水を結膜下に誘導し、涙過胞の形成により眼圧を調節することを意図とする手術である。しかし、時間の経過とともに結膜の線維芽細胞が涙過胞部に移動・増殖し房水の通路が閉鎖され、涙過胞が消失して再び眼圧が上昇することが多く見られる。従って、緑内障涙過手術の成否は、術後の涙過胞の維持にかかっているといえる：現在、線維芽細胞の増殖を抑制してこの涙過法を維持するために、5-フルオロウラシルやマイトマイシンC等の抗癌剤が投与されているが、強膜壊死を始め副作用が強く問題が多い。そこで、抗癌剤にかかる新しいタイプの新薬が強く期待されている。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らはこのような状況に鑑み、RGDペプチドについて試験管内評価を行ったところ、ヒト結膜線維芽細胞や網膜芽細胞腫の接着に対して阻害効果があることがわかった。さらに主鎖が環状であるRGDペプチドでは細胞接着に対する阻害効果が増強され、かつ持続性が高まることを見いだした。本発明はこのような知見に基づく下記発明である。

【0009】アルギニン-グリシン-アスパラギン酸またはアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むペプチド、またはそのペプチドの薬学的に許容できる塩、を有効成分とする緑内障治療薬。

## 【0010】

【発明の実質的範囲】アリギニン-グリシン-アスパラギン酸(Arg-Gly-Asp)なるアミノ酸配列を含むペプチドおよびアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸(Arg-Sar-Asp)なるアミノ酸配列を含むペプチドは前記RGDペプチドである。本発明のペプチドは通常の線状構造を有するペプチドであってもよい。しかし前記した理由により、より好ましくは環状のペプチドである。

【0011】本発明におけるペプチドのアミノ酸残基数は、特に限定されないが、20以下、特に10以下が好ましい。アミノ酸残基数のより多いペプチドではRGD等の有効な配列部分が立体障害などで隠されて充分な効果が発揮されないおそれがある。ただし、(Arg-Gly-Asp)や(Arg-Sar-Asp)なる配列を含む比較的短いアミノ酸配列（たとえば、アミノ酸残基数5以下の配列）の2以上の繰り返しからなるペプチドはこの限りではない。しかし、合成の容易さや安定性からはこの場合であってもアミノ酸残基数は上記のように短いことが好ましい。

【0012】環状化されたRGDペプチドとして、2つのシステイン残基のメルカプト基同士をジスルフィド結合で結合して環状化した環状のRGDペプチドが知られている。本発明における環状のペプチドはこのような環状のペプチドであってもよい。しかし、ジスルフィド結合はペプチド結合に比較して安定性が低いことより、本発明においてより好ましい環状のペプチドは、下記ペプチド結合により環状化されている環状のペプチドである。

【0013】本発明におけるペプチドとして好ましい環状のペプチドは、ペプチド結合により環状化されている環状のペプチドである。ペプチド結合は $\alpha$ 位のアミノ基と $\alpha$ 位のカルボキシル基が縮合して生成するペプチド結合のみからなることが好ましい。すなわち、環状ペプチドの両末端（すなわち、N末端とC末端）の $\alpha$ 位のアミノ基と $\alpha$ 位のカルボキシル基が縮合した構造を有する環状のペプチドが好ましい。このような環状のペプチドは末端基（ $\alpha$ 位のアミノ基や $\alpha$ 位のカルボキシル基）が存在しないことにより、安定性がさわめて高いという特徴を有する（前記環状ペプチドにかかる公知例参照）。

【0014】しかし、場合によっては、本発明におけるペプチドは側鎖のアミノ基やカルボキシル基がペプチド結合することにより生成する環状のペプチドであってもよい。このような環状のペプチドは $\alpha$ 位のアミノ基または $\alpha$ 位のカルボキシル基が末端基として残存することが通例であり、安定性の面で上記末端基のない環状のペプチドよりも劣ることが少なくない。

【0015】なお、上記の環状のペプチドの説明は合成法を限定するためのものではない。たとえば環状化はアミノ酸配列の任意のアミノ酸残基間で行うことができる。たとえば、RGD配列のRとGの間でペプチド結合を生成して環状化を行うことができる。

【0016】本発明におけるペプチドとしては公知のものであってもよい。環状のペプチドとしてい、たとえば、前記特開平2-174797号公報や特開平4-264097号公報に記載されている環状のペプチドが好ましい。特に好ましい環状のペプチドは、このような線状ペプチドのN末端の $\alpha$ 位のアミノ基とC末端の $\alpha$ 位のカルボキシル基が縮合した構造を有する環状のペプチドであり、以下このようなタイプの環状のペプチドを単に環状ペプチドという。具体的な環状ペプチドとして特に好ましいものは環状[-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]からなるアミノ酸配列を有する環状ペプチドである。

【0017】本発明におけるペプチドは側鎖にカルボキシル基を有し、またアミノ基などの塩基性基を有する場合もあることより、このペプチドの塩を形成させることができる。本発明においてこのペプチドの薬学的に許容できる塩もまた線内障治療薬として有用である。塩としては、たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、こはく酸塩などがある。

【0018】本発明におけるペプチド（またはその塩）の投与量としては、特に限定されないが、1眼1日あたり0.001~100mg、特に0.01~10mgが適当である。

【0019】本発明のペプチド（またはその塩）は製剤化して局所（すなわち眼）に投与されることが好ましい。しかしこれに限定されるものではなく注射などによる眼以外の部分への投与や経口投与もできる。製剤は通常の眼科用液状製剤は勿論、懸濁液状製剤、軟膏状製剤、固体担持製剤などであってもよい。特に有効成分を徐放することができる徐放性担持体に担持されて使用されることが好ましい。徐放性担持体としては、通常の眼科用徐放性担持体、たとえばエチレン-酢酸ビニル共重合体などを素材とした徐放性担持体が使用できる。

【0020】以下、本発明を実施例によって具体的に説明するが、本発明はこの実施例に限られるものではない。

【0021】なお、実施例に用いた環状[-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]からなるアミノ酸配列を有する環状ペプチド（以下e-RGDSPAという）は、特開平2-174797号公報記載の実施例1に従って合成したものを利用した。また、Arg-Gly-Asp-Serからなるアミノ酸配列を有する線状ペプチド（以下RGDSという）、およびArg-Gly-Asp-Trpからなるアミノ酸配列を有する線状ペプチド（以下RGDWという）は、公知の方法で合成したものを利用した。

## 【0022】

## 【実施例】

【例1：RGDペプチドによる細胞接着阻害効果】ヒト結膜織芽細胞、ヒト網膜芽腫細胞、ウサギ水晶体上皮50細胞をそれぞれRGDペプチドと共に培養し、経時的に

5

24時間後まで接着細胞数を計測した。その結果を表1～6に示す。表1～6に培養時間とペプチド濃度に対する細胞の接着抑制率(%)を示す。表に示すように特にc-GRGDSPAは各種細胞に対して接着阻害活性を持ち、培養開始後24時間後もその効果を保っていた。

【0023】また、網膜芽腫細胞を培養開始5日後、RGDペプチドを含む培養液に交換し、その後の培養細胞の形態的变化を経時的に観察した。ペプチドを添加する\*

6

\*前の細胞は培養皿に接着し、神経細胞用の突起を出していたが、添加1時間後にはその突起の生長が抑制され、その後には、ほとんどの細胞は目立たなくなってしまった。さらに、細胞は球形になり、集塊を作り浮遊した。RGDペプチドは網膜芽腫細胞の接着に対して明らかに阻害的に働いていることが確認された。

【0024】

【表1】

抑制率 [ペプチド:c-GRGDSPA、細胞:ヒト結膜織維芽細胞]					
培養時間(hr)	0	1	3	6	24
濃度(mg/ml)					
2	0±0	27.3±9.1	55.8±24.1	86.3±7.5	
1	0±0	8.7±7.8	35.7±3.3	49.8±8.4	
0.5	0±0	1.4±1.5	4.6±3.3	10.5±12.2	
0.25	0±0	0±0	0±0	13.4±13.7	
0.125	0±0	0±0	0±0	14.6±6.6	
0	0±0	0±0	3.2±3.2	0±0	1.0±1.7

【0025】

※※【表2】

抑制率 [ペプチド:RGDS、細胞:ヒト結膜織維芽細胞]					
培養時間(hr)	0	1	3	6	24
濃度(mg/ml)					
2	0±0	0±0	25.1±13.8	69.4±20.4	
1	0±0	0±0	4.4±3.0	6.2±5.5	
0.5	0±0	0±0	0±0	3.7±4.3	
0.25	0±0	0±0	0±0	0±0	
0.125	0±0	0±0	0±0	0±0	
0	0±0	0±0	3.2±3.2	0±0	1.0±1.7

【0026】

★★【表3】

抑制率 [ペプチド:c-GRGDSPA、細胞:ヒト網膜芽腫細胞]				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(mg/ml)				
0.1		3.5±1.0	100±0	100±0
0.05		0±0	100±0	100±0
0.025		0±0	29.2±17.0	63.3±17.0
0.0125		0±0	0.9±1.2	2.1±2.9
0	3.7±5.3	3.5±2.5	3.8±0.8	0±0

【0027】

☆☆【表4】

〔ペプチド：RGDS、細胞：ヒト水晶体上皮細胞〕				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(ng/ml)				
0.1		4.3±2.2	99.2±2.0	9.3±9.4
0.05		0±0	75.9±9.1	4.4±4.5
0.025		0±0	9.6±3.0	0±0
0.0125		0±0	3.5±3.0	0±0
0	3.7±5.3	3.5±2.5	3.8±0.8	0±0

【0028】

\* \* 【表5】

抑制率〔ペプチド：c-GRGDSPA、細胞：ウサギ水晶体上皮細胞〕				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(ng/ml)				
0.1		91.7±12.8	100±0	100±0
0.05		81.4±14.1	100±0	100±0
0.025		27.8±7.1	100±0	100±0
0.0125		16.2±10.7	54.2±15.5	96.5±4.1
0	3.7±5.3	3.9±2.5	6.6±2.3	5.4±3.6

【0029】

\* \* 【表6】

抑制率〔ペプチド：RGDS、細胞：ウサギ水晶体上皮細胞〕				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(ng/ml)				
0.1		62.1±13.2	100±0	69.2±12.3
0.05		31.6±10.0	100±0	45.5±11.3
0.025		8.1±3.6	24.2±9.8	5.9±2.7
0.0125		9.4±5.9	5.3±3.6	0±0
0	3.7±5.3	3.9±2.5	6.6±2.3	5.4±3.6

【0030】 [例2: RGDペプチドによる細胞接着阻害効果] 接着した細胞を剥がす効果について検討するため、フィブロネクチンとコラーゲン タイプIV（以下Co14という）をそれぞれコートしたプレート上でウサギ水晶体上皮株細胞（以下TTL-86という）、ヒト水晶体上皮細胞（以下HEL-17という）および網膜芽細胞腫株細胞（以下WERI-mという）を24時間培養後RGDペプチドを添加し3時間後、総接着細胞数を計測した。その結果を表7～8に示す。表7はフィブロネクチンコートアーレートを用いて上記3種の細胞を培養した場合の細胞接着抑制率（%）を示す表であり、表8はCo14コートアーレート

★レートを用いて TTL-86を培養した場合の細胞接着抑制率（%）を示す表である。

【0031】 表7～8に示されるように、フィブロネクチンコートプレートにおいてRGDペプチド50 μg/mlを添加することにより、TTL-86およびHEL-17の接着を95%以上、WERI-mの接着を85%以上抑制していた。また、Co14コートプレート上ではTTL-86の接着を1mg/mlで100%抑制し、250 μg/mlで66%抑制した。

【0032】

【表7】

ペプチドの種類	ペプチドの濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	細胞の抑制		
		TOTL-86	HEL-17	VERI-6
c-GRGDSPA	200	100 %	98.7 %	100 %
	100	99.7 %	100 %	100 %
	50	97.8 %	95.0 %	86.0 %
RGDS	500	93.2 %	76.1 %	79.2 %
	250	73.0 %	57.2 %	41.7 %
	125	27.2 %	28.3 %	13.2 %
RGDW	500	82.8 %	67.9 %	61.8 %
	250	42.9 %	26.4 %	59.2 %
	125	28.8 %	10.7 %	9.7 %

【0033】

【表8】

ペプチドの種類	ペプチドの濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	細胞の種類	
		TOTL-86	HEL-17
c-GRGDSPA	1000	96.3 %	80.0 %
	500	79.3 %	65.0 %
	250	65.5 %	55.0 %
	125	23.2 %	15.0 %
RGDS	2500	26.0 %	20.0 %
	1250	20.4 %	15.0 %
	675	-6.7 %	5.0 %
	340	-8.2 %	2.0 %
RGDW	2500	28.5 %	20.0 %
	1250	16.7 %	10.0 %
	675	0.8 %	5.0 %
	340	-2.0 %	2.0 %

【0034】【例3：緑内障術後の纖維芽細胞増殖に対する効果】

フロントページの続き

(72)発明者 田野 保雄

兵庫県神戸市東灘区鴨子ヶ原3-13-25

(72)発明者 切通 彰

大阪府大阪市中央区石町1-1-11-1305

\*するRGDペプチドの効果】緑内障手術は涙過手術であり、術後結膜纖維芽細胞の増殖により、効果がなくなることが多い。

そこで細胞接着阻害活性をもつRGDペプチドによる効果を検討するため、有色家兎眼に線維柱帯切除術を施行し、片方の眼に0.2mlのRGDS(5mg/ml)またはc-GRGDSPA(1mg/ml)を結膜下注射し、他眼に同量の溶媒のみを投与した。術後の眼圧を空気眼圧計にて測定し、涙過胞の状態を顕微鏡下で観察した。その結果、対照眼では平均5日で涙過胞が消失したのに対し、RGDS投与群では平均13日、c-GRGDSPA投与群では平均15日まで有意に涙過胞の存在期間が延長した。眼圧は、対照眼では平均10日で眼圧の上昇が見られたのに対し、RGDS、c-GRGDSPA投与群では眼圧上昇までの期間が延長し、平均21日に眼圧の上昇が認められた。

【0035】  
【発明の効果】実施例に示すように、RGDペプチドは緑内障の治療に有効であり、特に環状のRGDペプチドは顕著な効果を示す。

DERWENT-ACC-NO: 1998-140931

DERWENT-NAME: Israel

\~4~COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD\~14~

TITLE: Glaucoma preventing composition - contains peptide containing amino acid sequence of arginine-glycine-aspartic acid or arginine-sarcosine-aspartic acid

INVENTOR-NAME:

PRIORITY-DATA: 1996JP-0164849 (June 25, 1996)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES	MAIN-IPC	
JP 10017488 A	January 20, 1998	N/A
A61K 038/00		006

INT-CL (IPC): A61K038/00; C07K005/08 ; C07K007/64 ;  
C07K014/78

ABSTRACTED-PUB-NO: JP10017488A

BASIC-ABSTRACT: Glaucoma preventing composition contains peptide containing amino acid sequence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD) or arginine-sarcosine-aspartic acid or their salts.

The peptide preferably has at most 20 amino acid residues. The peptide is cyclised through N-terminal and C-terminal by peptide linkage. The cyclic peptide comprises an amino acid sequence of cyclic [-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]. The peptide or its salt is carried on a carrier for controlled release.

ADVANTAGE - The agent, RGD peptide especially cyclic RGD, has preventing effect for glaucoma by the inhibitory activity to intercellular adhesion e.g. human conjunctiva fibroblast and human retinoblastoma.

ABTX:

Glaucoma preventing composition contains peptide containing amino acid sequence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD) or arginine-sarcosine-aspartic acid or their salts.

ABTX:

ADVANTAGE - The agent, RGD peptide especially cyclic RGD, has preventing effect

for glaucoma by the inhibitory activity to intercellular adhesion  
e.g. human  
conjunctiva fibroblast and human retinohlastoma.